

Recherche de microorganismes capables de contrôler des souches de *Ralstonia solanacearum* isolé et caractérisé dans l'Office du Périmètre Irrigué de Baguinéda

Magnan Diarra¹, Adounigna Kassogué¹, Amadou Hamadou Babana^{1*}

¹Laboratoire de recherche en Microbiologie et Biotechnologie microbienne, Faculté des Sciences et Techniques, Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, Fax: (+223) 222 64 99 ; BP E3206 Bamako, Mali.

*Correspondance, courriel: adoukass@yahoo.fr

RESUME : *Ralstonia solanacearum* largement répandu dans les zones à climat tropical, subtropical ou chaud, dans le monde entier. *Ralstonia solanacearum* est un bacille Gram-négatif, de longueur 0,5-1,5 µm, portant un flagelle polaire unique. Sa réaction positive de coloration des granules de poly-β-hydroxybutyrate au Sudan Black B ou au Nile Blue le distingue des *Erwinia spp.* De plus, ses pôles se colorent fortement au carbol-fuch sine. Sur milieu gélosé, au départ ses colonies sont lisses, luisantes et opalescentes, mais brunissent avec l'âge.

Parmi les légumes et fruits cultivé, la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) espèce de plante herbacée appartenant à la famille des solanacées est l'un des légumes les plus important au Monde. La tomate est parmi les légumes les plus cultivé et consommé dans le monde entier.

Au mali la tomate est cultivée à Ségou (zone office du Niger), Koulikoro/Kati, Banguinéda, Sikasso ou la production est la plus grande.

Malheureusement sa production est confrontée à d'énormes difficultés principalement la bactériose vasculaire ou flétrissement bactérien causé par *Ralstonia solanacearum*.

Pour minimiser les dégâts causés par ce pathogène nous nous sommes fixé comme objectif d'utiliser les bio-inoculant pour lutter contre *Ralstonia solanacearum*.

Le présent travail nous a permis d'isoler 16 souches de *Ralstonia solanacearum* dont la caractérisation biochimique et le test hypersensibilité a montré qu'elles appartiennent toutes au Biovar 3 et à la race 3.

Le bio-inoculant tel que *Bacillus sp*, CH2, OP6 et DL2, DL5' ont produit un effet antagoniste très remarquable sur *Ralstonia solanacearum* au laboratoire.

Mots clés : *Ralstonia solanacearum* ; Tomate ; flétrissement bactérien ; bio-inoculant

1. INTRODUCTION :

Parmi les plantes maraîchères cultivées dans le monde, la tomate est l'une des plus largement produites en plein champ et dans les jardins (Salunkhe et Kadam, 1998).

La tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) espèce de plante herbacée appartenant à la famille des solanacées (Beamonte, 2012) est l'un des légumes le plus important au monde (Naika et al. 2005). Elle est parmi les légumes les plus cultivées et consommées dans les monde entier avec une

superficie totale cultivée de 4 688 336 hectares ; pour une production totale de 163 ; millions de tonnes de tomates produite en 2013 (FAO-STAT, 2015).

Cependant, cette production est inégalement répartie. L'Asie occupe le premier rang avec 45 % de la production mondiale, l'Europe le 2ème rang avec 22 % suivie de l'Amérique 19 % et l'Afrique 12 % (FAO, 2003). Tandis qu'au niveau mondial le rendement moyen est d'environ 25 t.ha-1 (Anonyme 1, 1989 ; Messiaen et al. 2000), en

Afrique au sud du Sahara il n'est que de 10 t/ha (Nono et al., 2001).

Grâce à sa richesse en minéraux (Ca, K, Mg, Na, Fe...), acides aminés essentiels, fibres alimentaires, fer, phosphore, sucres et vitamines ; la consommation de la tomate contribue à un régime sain et équilibré sur le plan nutritionnel (Naika et al. 2005).

Au Mali la tomate est cultivée à Ségou (zone Office du Niger), Koulikoro/ Kati, Baguinéda, Sikasso. La plus grande production est enregistrée dans les zones de Ségou, Koulikoro/ Kati et Baguinéda (Maiga et al. 2004).

Malheureusement sa production est confrontée à d'énormes difficultés principalement la bactériose vasculaire ou flétrissement bactérien causé par *Ralstonia solanacearum*.

Pour minimiser les dégâts causés par ce pathogène nous nous sommes fixé comme objectif d'utiliser les bio-inoculants pour lutter contre *Ralstonia solanacearum*.

2. MATERIEL ET METHODES :

2.1. Site d'échantillonnage :

Les échantillons de sols ont été collectés dans les champs de certaines zones de l'Office du Périmètre Irrigué de Baguinéda (OPIB).

Les échantillons de sol ont été prélevés dans trois champs puis nommés respectivement champ A (champ très dévasté par le flétrissement ; 12.6590° Nord-007.732992° Ouest), champ B (champ non attaqué par le flétrissement ; 12.66042° Nord-007.73114° Ouest) et champ C (champ entièrement dévasté par le flétrissement ; 12.66152° Nord-007.73013° Ouest).

Les échantillons de pied de tomate flétrie ont été prélevés dans quatre champs nommés respectivement champ D (12.61293° Nord-007.74164° Ouest), champ E (12.61258° Nord-007.74220° Ouest), champ F (12.60024° Nord-007.74316° Ouest) et champ G (12.60378° Nord-007.75325° Ouest).

2.2. Matériel utilisé

De l'eau claire et un verre propre ont été utilisés pour effectuer le test du "verre d'eau" qui permet de vérifier si l'on a un écoulement bactérien à partir

des vaisseaux d'une tige de plante sectionnée. Il s'agit d'un test caractéristique d'une contamination des plantes par la bactérie *R. solanacearum*. Une solution d'hydroxyde de potassium KOH (3%), une lame de microscope et un cure-dent stériles ont été utilisés pour parfaire le test de Gram sur les colonies bactériennes isolées.

2.3. Méthodes d'étude :

2.3.1. Test d'exsudation des tiges de tomates

Au champ, la technique de test de suintement bactérien ou encore appelée test du verre d'eau a été utilisée au cours des travaux. Chaque échantillon est placé dans un tube contenant 20 ml d'eau permutée stérile et retiré après 3 heures. Un macérât blanc laiteux caractérise la présence de *Ralstonia solanacearum* dans le système vasculaire de la plante évitant ainsi toute confusion avec des symptômes dus à d'autres infections bactériennes causées par *Clavibacter michiganensis sepedonicus* ou des bactéries du genre *Dickeya* ou encore des maladies fongiques provoquées par *Verticillium sp.* et *Fusarium eumartii* (Priou et al., 1999). Les macérâts ont été conservés à 20°C jusqu'à leur utilisation au laboratoire (Martin et al., 1982).

2.3.2. Analyse des échantillons :

2.3.2.1. Ensemencement du milieu de culture par les échantillons :

2.3.2.2. Isolement de *Ralstonia solanacearum* à partir du sol :

Ainsi, 1 gramme de chaque échantillon de sol des champs A, B et C a été pesé à l'aide d'une balance de précision. Après la pesée, chaque échantillon a été transvasé aseptiquement dans des tubes à essai contenant 9 ml de solution saline stérile (8g de NaCl/l). Les différents échantillons ainsi traités ont été mis sous agitation à 250 rpm (**agitateur : INFORS HT Labotron**) pendant 20 minutes. Après agitation, 1ml de surnageant a été prélevé de chaque échantillon et placé dans des tubes à essai stériles. La solution obtenue a été considérée comme solution mère.

La solution mère de chaque échantillon a subi une dilution décimale jusqu'à 10⁻⁵. Un millilitre de chaque solution mère et de chacune des dilutions ont été étalées sur milieu de culture **SMSA-E**. Un litre du milieu **SMSA-E** contient : 10.0 g de

Bactopeptone (Difco), 5 ml de Glycerol, 1.0 g de Casamino acide (Difco), 15.0 g d'agar bactériologie (Difco), 2.5 ml de Polymyxin B 1% sulfate, 125µl de Cristal violet 1%, 625µl de Bacitracine 1%, 1,25µl de Penicilin 0,1%, 10.0 g de tryptone, 125µl de Chloramphenicol 1%, 2,5ml de Cycloheximide 1% et ajusté le pH à 7.5.

Cette expérience a été répétée deux fois et des boîtes témoins ont été réservées pour chaque échantillon. Les boîtes de Pétri ainsiensemencées ont été renversées et placées dans un incubateur à 30°C pendant 24 à 48 heures.

2.3.2. 3. Isolement de *Ralstonia solanacearum* à partir des plants malades :

R. solanacearum s'isole aisément sur milieux gélosés, en particulier sur le milieu de **Kelman (1954)** additionné de chlorure de tetrazolium (TTC).

La tige de chaque échantillon de plant infecté a été aseptisée respectivement par l'alcool 70%, 2 % d'eau de javel puis rincé avec l'eau distillée stérile. La tige désinfectée de chaque échantillon a été sectionnée au environ de 10 cm de longueur puis fendu en deux demi cylindre. La partie section de chaque demi- cylindre de la tige a été déposé directement en contact sur milieux TZC agar **Kelman (1954)** contenu dans les boîtes de Pétri.

Un litre du milieu Kelman's TZC agar contient: 10.0 g de dextrose, 10 10.0 g de peptone, 1,0 g de casamino acide (Difco), 18 d'agar, puis additionné de 5 ml de chlorure de tetrazolium (TTC).

2.3.3. Purification des colonies de *Ralstonia solanacearum*

Les différentes colonies bactériennes qui ont poussé sur le milieu **SMSA-E** et TZC agar **Kleman (1954)** et montrant un aspect morphologique caractéristique des *Ralstonia solanacearum* ont été purifiées par méthode d'épuisement sur milieu solide. Puis les boîtes ainsi traitées ont été renversées et incubées à l'étuve à 28°C pendant 48 heures.

2.4 Caractérisation des souches isolées

2.4.1. Caractérisation par sensation d'odeur d'isolat de *Ralstonia solanacearum*

Les souches de *R. solanacearum* qui s'accompagne d'une odeur caractéristique de chaussette sale ont été sélectionnées.

2.4.2. Caractérisation macroscopique et microscopique des cultures microbiennes :

2.4.2.1. Caractéristique macroscopique :

L'objectif de l'observation macroscopique était de décrire les aspects morphologiques des colonies. Elle a été faite soit à l'œil nu, ou à la loupe. Au cours de cette analyse, l'aspect, la consistance, la forme et la couleur des colonies a été déterminé.

2.4.2.2. Caractéristiques microscopiques après coloration Gram :

La technique de coloration de Gram a été utilisée selon la méthode classique (**Douey et al, 2003**). L'aspect morphologique des bactéries a été observé avec un microscope optique.

2.4.2.3. Test au KOH 3%

Une solution d'hydroxyde de potassium KOH (3%), une lame de microscope et un cure-dent stériles ont été utilisés pour parfaire le test de Gram sur les colonies bactériennes isolées.

2.5. Caractérisation enzymatique :

2.5.1. Test de la catalase

Le test de la catalase permet de mettre en évidence les bactéries qui possèdent la catalase. Pour la réalisation de ce test, les différents isolats ont été déposés directement sur une lame. Puis, à l'aide de la pipette Pasteur, une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂) a été déposée sur la culture bactérienne et la lame observée pour la formation ou non de bulles. La formation de bulles correspond à la production de catalase donc à une bactérie à catalase positive (catalase +). La non production de bulles correspond à l'absence de catalase, donc à la présence d'une bactérie à catalase négative (catalase -).

2.5.2. Test de l'oxydase :

Le test de l'oxydase permet d'identifier les bactéries qui possèdent l'enzyme cytochrome oxydase. Pour identifier les bactéries possédant cette enzyme, nous avons déposé quelques gouttes d'une solution de 1% de N,N-Diméthyl-phénylène

diamine Dihydrochloride directement sur la culture. L'apparition d'une coloration rouge-mauve en 1 minute indique la présence d'une bactérie à oxydase positive (oxydase+), tandis que l'apparition d'une couleur rouge et l'absence de couleur après 1 minute indiquent l'absence de l'oxydase (oxydase-). Lorsque nous désirons conserver la souche, il est préférable de prélever un peu de croissance avec une pipette pasteur boutonnée et la déposer sur un papier buvard et procéder comme précédemment.

2.5.3. Le test de détermination des biovars de *Ralstonia solanacearum*

La technique qui permet de distinguer les différents biovars de *Ralstonia solanacearum* au sein des différents isolats était basée sur des tests biochimiques en rapport avec les aptitudes des souches à utiliser et/ou à oxyder trois disaccharides, notamment le maltose, le lactose et le cellobiose ainsi que trois hexoses alcools le mannitol, le sorbitol et le dulcitol (Hayward, 1964 ; Hayward et al., 1990).

Le milieu de base utilisé à cet effet se compose de 1.0 g Bacto-peptone, 1.0 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.2 g de KCl, 0.2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g de Bleu de Bromothymol, 3.0 g d'Agar dans un litre d'Eau distillée 1.000 ml (Hayward, 1964 et 1976). Le pH a été ajusté à 7-7.1 en y ajoutant quelques gouttelettes de solution de NaOH 40% poids/volume, puis on mélange le milieu par chauffage et agitation constante. Le milieu ainsi obtenu avait une coloration vert olive. Il a été réparti dans des tubes de 9 ml correspondant au nombre d'hydrates de carbone à tester avant autoclavage à 121°C pendant 21 minutes. Toutes les solutions de sucres ont été stérilisées par filtration (Seitz ou membrane à millipores de 0.22 microns) dans des tubes à essai préalablement stérilisés. Il a été ajouté environ 1 ml de chaque solution de 10% d'hydrate de carbone au 9 ml du milieu de base refroidi à 60°C afin d'obtenir une concentration finale de 1%.

L'inoculum était une culture bactérienne de 48 h. Les tubes contenant les différents sucres ont étéensemencés en prélevant des colonies des souches pures à l'aide de cure-dents stériles. Il y avait trois répétitions par sucre et par souche. Les tubes ont été incubés à 28°C et examinés à 48 h et 72 h. Un résultat positif du test a été marqué par une

variation du pH acide (un changement de couleur du vert olive au jaune). Selon Martin et al. (1982) ; Schaad et al. (2001) chez les alcools de sucre, la réaction survient entre 3 et 5 jours, pour les disaccharides elle est un peu plus longue.

2.6. Test d'hypersensibilité du tabac :

Le test l'hypersensibilité du tabac a été un test développé par Lozano et Sequeira (1970), était utilisé pour faire la distinction entre les races 1, 2 et 3. Le test a été réalisé en utilisant les feuilles de tabac par infiltration des cellules bactériennes dans le parenchyme des feuilles avec une bonne seringue. Le flétrissement et la mort des feuilles de tabac après huit (8) jours indiquent la race 1. Le jaunissement de la zone d'infiltration indique la race 3. L'hypersensibilité avec les tissus nécrosés blanches de la zone entre les veines indiquait la race 2.

2.7. La production de pigments fluorescents :

Les souches bactériennes retenues, cultivées sur le milieu King B dans des boîtes de pétri, puis incubées pendant 48h à 30°C ont été éclairé avec une lampe à rayons ultra-violet. Elles ont été mises dans une enceinte obscure, sous la lampe. La boîte de pétri présentant une luminosité brillante à l'obscurité était fluorescente (Mezaache, 2012).

2.7. Activité antagoniste des bio-inoculants sur *Ralstonia solanacearum*

L'activité antibactérienne des isolats a été déterminée par une méthode simple qui a consisté à faire un ensemencement en masse, pour cela, le milieu gélose nutritif agar a été coulé sur 1 ml de suspension de la bactérie pathogène (*Ralstonia solanacearum*). Après solidification, les bio-inoculants tel que *Bacillus sp*, CH2, OP6, DL2, DL5' et Dr2 ont été déposés en surface à l'aide d'un emporte-pièce. Les diamètres de zones d'inhibition observées après incubation de 48h à 72h ont été mesurés (Dicko, 2013).

3. RESULTATS :

3.1. Souches bactériennes isolées

Les résultats d'analyse des échantillons de sols et de plants infectés de tomate provenant des

différents sites sont consignés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Distribution des *Ralstonia solanacearum* isolés de différents échantillons de sol et de plants infectés de tomate collectés dans les différents champs de Baguinéda.

Sites d'échantillonnage	Origine des isolats isolés	Présence d'exsudats bactérienne	Nombre d'Isolats	Nombre total d'isolat retenu
Champs A	Sol	-	AR ₁ , AR ₂	17
Champs B	Sol	-	BR ₁ , BR ₂	
Champs C	Sol	-	CR ₁ , CR ₂	
Champs D	Plant de Tomate infecté	Positive	DR ₁ , DR ₂ , DR _{3b} , DR ₄	
Champs E	Plant de Tomate infecté	Positive	ER ₁ , ER ₂	
Champs F	Plant de Tomate infecté	Positive	FR ₁ , FR ₂ , FR _{2'}	
Champs G	Plant de Tomate infecté	Positive	GR ₁ , GR ₂	

Dix-sept isolats ont été isolés sur milieu de culture Kelman's TZC agar provenant de sol et de plants de tomate infectés puis purifiés

3.2. Caractérisation macroscopique des isolats

Des colonies virulentes, fluides ou encore dites « muqueuses » qui produisaient une grande quantité

d'exopolysaccharides ont été retenues. Ces colonies bactériennes caractéristiques vont d'une couleur uniforme blanc-crème à des colonies dont le centre prend une coloration rouge-rosé et elliptique, due à la formation intense ou non de formazan.

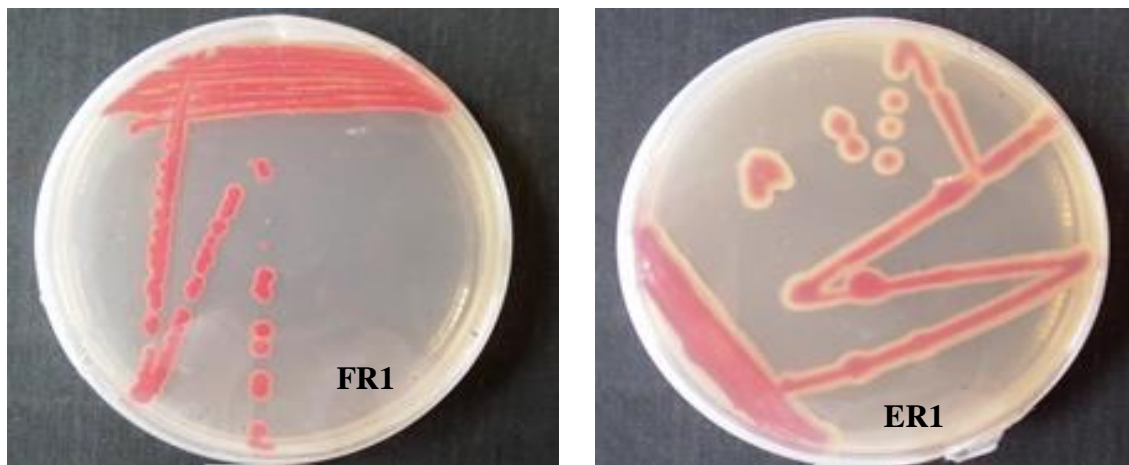


Figure 1 : Aspect macroscopique de quelques isolats sur milieux solide TZC

3.3. Caractérisation microscopique et enzymatique des isolats

Tableau 2 : La coloration Gram, le test au KOH, de catalase, d'oxydase et production de pigments fluorescents ont donné les résultats consignés dans le tableau 2.

Isolats	Gram	KOH	Catalase	Oxydase	Production de pigments fluorescents
AR ₁	-	+	+	+	-
AR ₂	-	+	+	-	-
BR ₁	-	+	+	+	-
BR ₂	-	+	+	-	-
CR ₁	-	+	+	-	-
CR ₂	-	-	+	+	-
DR ₁	-	+	+	+	-
DR ₂	-	+	+	+	+
DR _{3b}	-	+	-	+	-
DR ₄	-	+	+	+	-
ER ₁	-	+	+	+	-
ER ₂	-	+	+	+	-
FR ₁	-	+	+	+	-
FR ₂	-	+	+	+	-
FR _{2'}	-	+	+	+	-
GR ₁	-	+	-	+	-
GR ₂	-	+	+	+	-

Tous les isolats présentaient un Gram négatif et positif pour le test au KOH à 3% sauf l'isolat CR₂.

A l'exception de DR_{3b} et GR₁, la production de la catalase était positive pour toutes les autres souches.

La production d'oxydase a été positive pour la majorité des souches ; à l'exception des souches AR₂, BR₂ et CR₁, avaient une production négative.

3.4. La production de pigments fluorescents :

Seule la souche, DR₂ a été identifiée fluorescente, à cause d'une substance qu'elle produit et qui rougit le milieu de culture (le King B). La boîte de Pétri qui la renferme brille à l'obscurité, après avoir été préalablement éclairée avec une lampe à rayons ultra-violettes. Les autres souches n'ont pas été fluorescentes, car les boîtes de pétri qui les contiennent ne brillent pas à l'obscurité, après l'éclairement aux rayons ultra-violettes

3.5. Test pour la détermination du biovar :

Le passage de la coloration vert olive au jaune après ensemencement par piqûre des différentes souches indiquait que ce virage est un changement de P^H montrant une production d'acide. C'est la preuve que les souches utilisées dégradent les disaccharides et les hexoses alcools.

Tableau 3 : Détermination du biovar par l'utilisation des disaccharides et les hexoses alcools

Souches	Disaccharides		
	Cellobiose	Lactose	Maltose
AR ₁ , AR ₂	+	+	+
BR ₁ , BR ₂	+	+	+
CR ₁ , CR ₂	+	+	+
DR ₁ , DR ₂ , DR _{3b} , DR ₄	+	+	+
ER ₁ , ER ₂	+	+	+
FR ₁ , FR ₂ , FR' ₂	+	+	+
GR ₁ et GR ₂	+	+	+
Hexoses alcools			
	Mannitol	Dulcitol	Sorbitol
AR ₁ , AR ₂	+	+	+
BR ₁ , BR ₂	+	+	+
CR ₁ , CR ₂	+	+	+
DR ₁ , DR ₂ , DR _{3b} , DR ₄	+	+	+
ER ₁ , ER ₂	+	+	+
FR ₁ , FR ₂ , FR' ₂	+	+	+
GR ₁ et GR ₂	+	+	+
Biovar 3			

3.6. Test pour la détermination des races :

Toutes les souches bactériennes retenues ont provoqué le jaunissement sur les feuilles de tabac

traitées ; cela indiquait qu'elles appartiennent toutes à la race 3.



Figure 2 : Réaction d'hypersensibilité de quelques souches

3.7. Activité antagoniste des bio-inoculants sur *Ralstonia solanacearum*

isolées de la tomate et du sol. Le test de l'activité antagoniste est consigné dans le **tableau 3**

Tableau 3 : Activité antimicrobienne de quelques souches sélectionnées

La souche OP6 a montré une très forte activité antagoniste sur toutes les souches de *Ralstonia*

Souches sélectionnées	<i>Ralstonia</i> <i>sp</i> DR2	<i>Ralstonia</i> <i>sp</i> GR2	<i>Ralstonia</i> <i>sp</i> FR2	<i>Ralstonia</i> <i>sp</i> GR1	<i>Ralstonia</i> <i>sp</i> ER1	<i>Ralstonia</i> <i>sp</i> ER2
OP6	++++	++++	++++	++++	++++	++++
<i>Bacillus Sp</i>	++	±	++	++	++	++
CH2	+	-	++	++	+	+
DL2	+++	-	+	+	+	+
DL5'	+++	-	++	+	+	+
Dr2	-	-	±	±	-	-

- Pas d' halo, ± Halo moins clair, + Halo < 1 mm, ++ Halo < 5 mm, +++ Halo ≤ 10 mm, ++++ Halo > 10 mm.

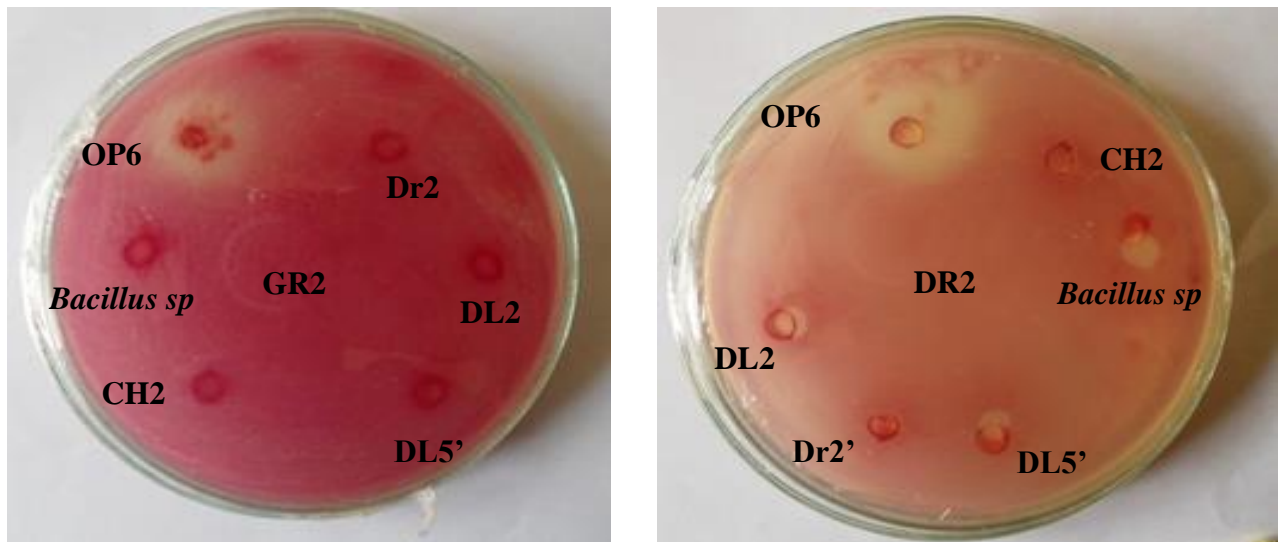


Figure 3 : Test activités antimicrobiennes des souches OP6, *Bacillus sp*, CH2, DL2, DL5' et Dr2 sur des pathogènes *Ralstonia sp* GR2 *Ralstonia sp* DR2

4. Discussion :

Ce test a permis d'isoler des souches de *Ralstonia* à partir du sol et des plants de tomates infectés.

Thera (2007) a également isolé et identifier des souches de *Ralstonia* partir du sol et des plants de tomates infectés au Mali. Les différentes souches

isolées étaient toutes de Gram négatif, KOH positif et de catalase positive. Le test d'oxydase était positif pour toutes les souches à l'exception d'AR2, BR₂ et CR₁.

Pour le test de production de pigments fluorescents seule la souche DR2 était positive. Ce résultat très

similaire à ceux obtenu par **Chaudhry et Rashid (2011)**.

Toutes les souches isolées ont oxydées les disaccharides et hexoses alcools en variant la couleur olive du milieu en jaune ; montrant qu'elles appartenaient toutes au Biovar 3. Ce résultat est identique à celui obtenu par **Thera (2007)** sur les souches qu'elle a isolé et identifié par le test Agdia ELISA, en provenant du sol et des plants de tomate malade.

Toutes les souches de *Ralstonia* retenue ont provoqué un jaunissement à la zone d'infiltration pendant le test d'hypersensibilité sur le tabac. Ce résultat d'hypersensibilité sur le tabac obtenu signifie que toutes les souches isolées appartiennent à la race 3.

Certaines souches de la collection du LaboREM-Biotech tels que OP6 et CH2 ont montré une très forte activité antagoniste sur toutes les souches de *Ralstonia* isolées de la tomate et du sol. Ce résultat est en conformité avec celui obtenu par certains chercheurs Ethiopiens qui ont prouvé l'efficacité au champ, de l'utilisation des microorganismes (*pseudomonas, mutants avirulent de ralstonia*) antagoniste de *Ralstonia*. (**Kuarabachew et al., 2007**).

5. CONCLUSION :

En totalité seize (16) souches de *Ralstonia* ont été isolées des différents échantillons de sols et de plants de tomates infectés dans l'Office Périmètre Irrigué de Baguinéda. Le présent travail nous a permis d'isoler 16 souches de *Ralstonia solanacearum* dont la caractérisation biochimique et le test hypersensibilité a montré qu'elles appartiennent toutes au Biovar 3 et à la race 3.

Le bio-inoculant tel que *Bacillus sp*, CH2, OP6 et DL2, DL5' ont produit un effet antagoniste très remarquable sur *Ralstonia solanacearum* au laboratoire.

Références Bibliographiques

- [1] **Anonyme 1 (1989)**. Tomato and Pepper production in the tropics. International symposium on integrated management practices, AVRDC, Tainan, Taiwan 21- 26 March 1989, 586 pp.

- [2] **Beamonte D., Krebs V., Saadé C., Melle L., Shindouk M.L. and Martinez L. (2012)**. AgriGuide E-TIC Vitrines du Sahel Sénégal et Mali 106p.
- [3] **Chaudhry Z. and Rashid H. (2011)**. isolation and characterization of *ralstonia solanacearum* from infected tomato plants of soan skesar valley of punjab. Pak. J. Bot., 43(6): 2979-2985
- [4] **Dicko A.H., Maiga K., Traoré D., Kassogué A., Fardji F.A., Fane R. (2013)**. Isolation and characterization of crop rhizospheric actinomycetes with antimicrobial activity in Mali. African Journal of Applied Microbiology Research. 2013 ; 2(1) :1-8.
- [5] **Douey D. et Iugovaz I. (2003)**. "Isolement et numération de *Bacillus Cereus* dans les aliments" Direction Générale des produits de santé et des aliments, Ottawa, MFLP 13p.
- [6] **FAO. (2003)**. La production de tomate. Dans les média demain 6-817, 1-6.
- [7] **Hayward A. C., 1990**. Proposal for a quick practical identification. In: Methods in phytopathology. Z. KLEMENT R., RUDOLPH and D.C. SANDS (edit.), AKADEMIKI KIADO, pp. 272-274.
- [8] **Hayward A.C. (1964)**. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 27, 265-77.
- [9] **Hayward A. C. (1976)**. Systematics and relationship of *Pseudomonas solanacearum*, p. 6-21. In: Proceedings of the 1st International Conference and Workshop on the Ecology and Control of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum*. L. Sequeira and A. Kelman (Edi.), North Carolina State University, Raleigh, N.C.
- [10] **Kelman A. (1954)**. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance

on tetrazolium media. *Phytopathology* 44: 693-695.

- [11] **Kuarabachew H., Assefa F. and Hiskias Y. (2007).** Evaluation of ethiopian isolates of *pseudomonas fluorescens* as biocontrol agent against potato bacterial wilt caused by *ralstonia (pseudomonas) solanacearum*. *Acta agriculturae Slovenica, 90(december 2007)2, 125–135*.
- [12] **Lozano J.C. and Sequeira L. (1970).** Differentiation of Races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. *Phytopathology* 60: 833-838.
- [13] **Maiga A., Diarra C. M., Traore B., Kamissoko J. et Diamoutene A. (2004).** Etude sur les référentiels technico économiques : diffusion des technologies d'irrigation et de production (DTIP- PCDA). Ministère de l'Agriculture, 45p .
- [14] **Martin C., French E.R. AND Nydegger U. (1982).** Strains of *Pseudomonas solanacearum* affecting Solanaceae in the Americas. *Plant disease*, Vol. 66, No 6, 458-460.
- [15] **Messiaen C. M., Migliori A. and Maison P. (2000).** Effet de la Mosaïque du tabac (TMV) sur la croissance et la fructification des cultures de tomate de plein champ dans le Sud-est de la France. *Etude de Virologie. Ann. Epihyt.*, 19 (4): 93-102.
- [16] **Mezaache S. (2012).** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Université Ferhat ABBAS Sétif Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Département de Microbiologie. N° /SNV/2012.
- [17] **Naika S., Lidt J. V., Hilmi M., Van D. B. (2005).** La culture de la tomate production, transformation et commercialisation. Fondation Agromisa et CTA, Wageningen. 105p
- [18] **Nono W.R., Swai I. S. and Chadha M. L. (2001).** Management of vegetable diseases in Eastern and Southern Africa: case study of tomato. In: Anonym, *Proceedings of the workshop on vegetable research and development in West Africa*. Eds. AVRDC Africa Regional Program, ARUSHA TANZANIA. pp. 19-31.
- [19] **Priou S., Aley P., Chujoy E. Lemaga B. and French E.R. (1999).** Integrated control of Bacterial wilt of potato. International potato center (CIP), Apartado 1558, Lima 12, Peru, pp. 1-30.
- [20] **Schaad N. W., Gauth P., Postnikova E. and Frederick R. (2001).** On-site one hour PCR diagnosis of bacterial diseases. APS congress, 2001.
- [21] **Thera T. A (2007).** BACTERIAL WILT MANAGEMENT: A PREREQUISITE FOR A POTATO SEED CERTIFICATION PROGRAM IN MALI. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Plant Pathology MONTANA STATE UNIVERSITY Bozeman, Montana.